

Aus der Kinderklinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. A. Windorfer

GENFREQUENZUNTERSUCHUNGEN FÜR DEN GALAKTOSE-1-PHOSPHAT- URIDYLTRANSFERASE-DEFEKT IM WESTUNGARISCHEN BEZIRK BUCSU

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

—

vorgelegt von
Gerhard Moll
aus Bremen-Blumenthal

1976

—

Aus der Kinderklinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. A. Windorfer

GENFREQUENZUNTERSUCHUNGEN FÜR DEN GALAKTOSE-1-PHOSPHAT- URIDYLTRANSFERASE-DEFEKT IM WESTUNGARISCHEN BEZIRK BUCSU



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gerhard Moll
aus Bremen-Blumenthal

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. F.C. Sitzmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Dezember 1976

Gliederung

1. Einleitung
- 1.1. Unsere heutigen Kenntnisse über die
Galaktosämie
- 1.2. Stoffwechsel der Galaktose und
Pathophysiologie
- 1.3. Krankheitsbild, Therapie und Prognose
2. Eigene Untersuchungen
- 2.1. Fragestellung
- 2.2. Probandengut und Methodik
- 2.3. Berechnung der Aktivität der Gal-1-PUT
- 2.4. Ergebnisse
- 2.4.1. Normalwerte und Altersverteilung der
Gal-1-PUT-Aktivität bei Gesunden
- 2.4.2. Überprüfung des Verteilungstyps der
Gal-1-PUT-Aktivität
- 2.4.3. Die Gal-1-PUT-Aktivität bei Hetero-
zygoten und Zwillingen
- 2.4.4. Berechnung der Genfrequenzen
3. Diskussion
4. Zusammenfassung
5. Literaturverzeichnis

Verwendete Abkürzungen:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Gal	Galaktose
Gal-1-(P)	Galaktose-1-Phosphat
Gal-1-PUT	Galaktose-1-Phosphat-Uridyl- transferase
Glc	Glukose
Glc-1-(P)	Glukose-1-Phosphat
Glc-6-(P)	Glukose-6-Phosphat
NAD	Nikotinamid-adenin-dinucleotid
UDP-Gal	Uridindiphosphogalaktose
UDP-Glc	Uridindiphosphoglukose

1. Einleitung

1.1. Unsere heutigen Kenntnisse über die Galaktosämie

Im Jahre 1906 gab B a u e r erstmalig die Galaktosebelastung als Leberfunktionsprüfung an, weil der Milchzucker ausschließlich in der Leber abgebaut wird.

Zwei Jahre später gelang es v o n R e u s s , das klinische Erscheinungsbild eines Kindes mit Milchezuckerharnruhr zu beschreiben.⁽²⁸⁾ 1917 fanden

G ö p p e r t und M a s o n bei Säuglingen mit Galaktosämie erhöhte Galaktosewerte im Blut und in den Geweben.⁽¹¹⁾

Sie vermuteten daher erstmalig eine Anomalie des Kohlenhydratstoffwechsels. Diese Vermutung wurde durch K o m r o w e r und S c h w a r z schließlich bestätigt, als sie einen erhöhten Gal-1-(P)-Spiegel in den Erythrozyten von Galaktosämikern nachweisen konnten.⁽²¹⁾ Daraus konnte man schließen, daß die

Anreicherung dieses Metaboliten auf einem Stoffwechseldefekt im Bereich der Umwandlung von Gal-1-(P) zu

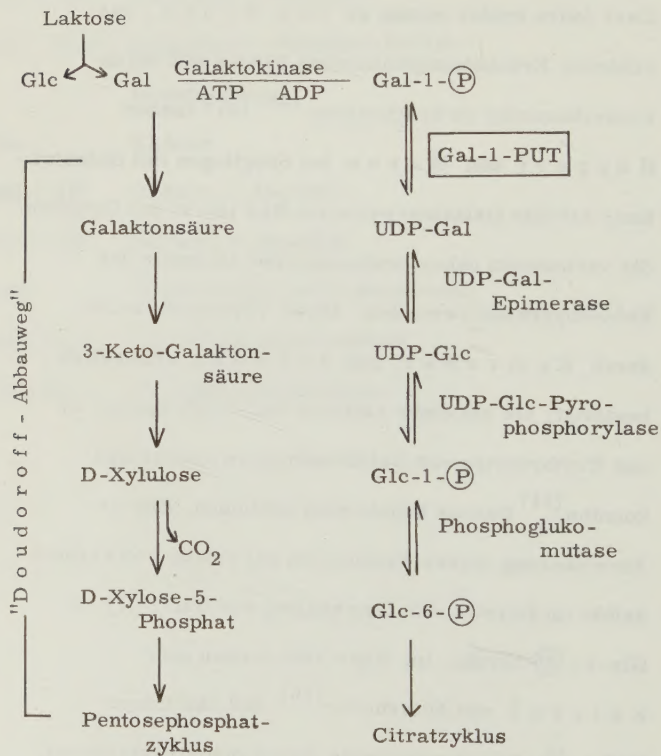
Glc-1-(P) beruht. Im Jahre 1956 fanden dann K a l c k a r und Mitarbeiter⁽¹⁶⁾, daß das Enzym

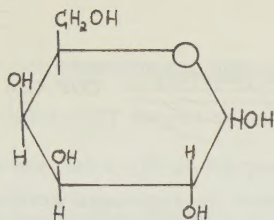
Gal-1-(P)-Uridyltransferase diesen Schritt katalysiert, und somit dessen Fehlen zur Galaktosämie führt, während die anderen Enzyme des sogenannten " L e l o i r - Stoffwechsels" in normaler Aktivität zu messen waren.

1.2. Stoffwechsel der Galaktose und Pathophysiologie

Der "Leloir-Stoffwechsel" mit dem

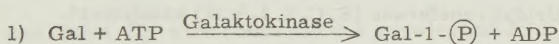
"Doudoroff-Abbauweg" (23)



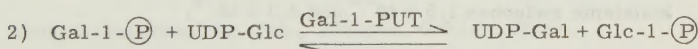


D-Galaktose, der 4-stereoisomere Zucker der D-Glukose, kommt in der Natur selten in freier Form vor. Man findet sie aber in glykosidischer Bindung als Baustein des Disaccharids Laktose, ferner ist sie bei der Synthese von Cerebrosiden, Gangliosiden und Glykoproteinen von großer Bedeutung.⁽⁶⁾

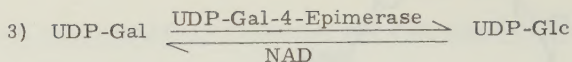
Wie im "Leloir-Stoffwechsel" aufgezeigt, ist eine reversible Umwandlung von Galaktose in Glukose möglich. Exogene Galaktose wird durch die Galaktokinase, die in Leber und Erythrozyten nachgewiesen wurde, in Gal-1-(P) umgewandelt.⁽³⁴⁾



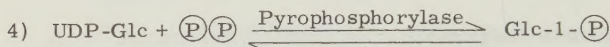
Gal-1-(P) kann nun mit UDP-Glc eine Transglykosidierungsreaktion eingehen, wobei der Austausch von Galaktose und Glukose stattfindet.



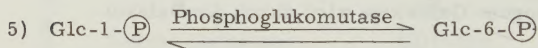
Unter Mitwirkung des Coenzyms NAD katalysiert die UDP-Gal-4-Epimerase die Umwandlung von UDP-Gal in UDP-Glc.



UDP-Glc kann zur Glykogenese herangezogen werden
oder durch eine Pyrophosphorylase zu Glc-1-(P)
metabolisiert werden.



Glc-1-(P) wird nun durch eine Phosphoglukomutase
über Glc-6-(P) in die Glykolyse oder Glykogenese
eingeschleust. ⁽⁹⁾



Die Reaktion 2) wird durch das Enzym Galaktose-1-
Phosphat-Uridyltransferase (E.C. 2. 7. 7. 12) katalysiert.

Das Ferment hat einen absoluten Bedarf an Cystein,
dagegen hemmt Mg^{++} die Reaktion. ⁽²²⁾ Gal-1-PUT
wurde 1951 von L e l o i r in Hefezellen nachgewiesen.

Das pH-Optimum liegt bei 8,4 - 8,9, die Michaelis-
konstante zwischen $1,5 \times 10^{-4}$ und $4,1 \times 10^{-4}$.

Als Folge der verminderten oder auch fehlenden Aktivität der Gal-1-PUT kommt es zur Ansammlung von Galaktose und Gal-1-(P) im Körper. Diese intermediären Stoffwechselprodukte des Galaktoseabbaus findet man bei Galaktosämikern vermehrt in Auglinse, Erythrozyten, Leber, Niere und Hirn.⁽¹¹⁾

Gal-1-(P) hemmt wahrscheinlich wichtige Enzyme des Zellstoffwechsels, unter anderem die Phosphoglukomutase und die Glc-6-(P)-Dehydrogenase.⁽²¹⁾

K i n o s h i t a und Mitarbeiter fanden, daß die aufgrund des Enzymdefektes angereicherte Galaktose und Gal-1-(P) nicht in UDP-Gal umgewandelt werden kann, sondern vielmehr Galaktose durch eine Aldoreduktase zu Galaktitol, einer Polyolverbindung, metabolisiert wird. Diese Alkoholverbindung bzw. das Gal-1-(P) wird heute als das vorwiegend schädigende Agens bei Galaktosämikern angesehen.^(18/19)

Galaktitol hemmt Transaminierungsvorgänge, die Zellatmung und führt zu Permeabilitätsstörungen.^(36/37)

So konnte K i n o s h i t a bei Galaktosämikern hohe Mengen Galaktitol im Urin, Plasma, Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur, vor allem aber in der Auglinse dieser Patienten nachweisen.⁽¹⁰⁾

1. 3. Krankheitsbild, Therapie und Prognose

Die Galaktosämie ist eine autosomal, rezessiv vererbte Anomalie des Kohlenhydratstoffwechsels, deren Ursache im Fehlen oder auch in der herabgesetzten Aktivität der Gal-1-PUT begründet ist.

Damit ist also die Metabolisierung von Galaktose stark eingeschränkt. Dies ist für die Pädiatrie von großer Bedeutung, weil Neugeborene ca. 20% ihres Kalorienbedarfs aus Galaktose gewinnen. (20)

Galaktosämische Kinder sind bei der Geburt gelegentlich durch Untergewicht (<2500 g) auffällig. Erste Krankheitszeichen treten mit Aufnahme der ersten Milchmahlzeit auf; somit stehen die klinischen Symptome der Galaktosämie in ursächlichem Zusammenhang mit der Ernährung durch Laktose. (32) Frauenmilch enthält ungefähr 7% Galaktose, Kuhmilch ca. 4%.

Galaktosämische Patienten lassen sich in drei Gruppen, je nach Schwere der Erkrankung, einteilen: (22/26)

1. Bei der schweren, akuten Form sind Erbrechen und durchfällige Stühle erste Symptome. Bedingt durch den Flüssigkeitsverlust findet man bald einen Hypotonus der Muskulatur; auch ein Hypertonus ist möglich, sofern schon ein Hirnschaden besteht. Die Kinder werden apathisch, die Gewichtszunahme nach etwa zehn Tagen bleibt aus.

Wichtiges Symptom ist ein stark geblähtes Abdomen mit einer deutlichen Vergrößerung der Leber, die oft auch mit einer Milzschwellung einhergeht. Meistens stellt sich auch bald ein Ikterus ein. Nach etwa vier bis sechs Wochen sieht man die ersten Linsenveränderungen. Bei Nichterkennen kann diese Form der Galaktosämie zum Tode führen: ⁽³⁰⁾

- a) Schwere Exsiccose mit Kreislauf- und Herzversagen
- b) Infektion (Pneumonie, Nabelsepsis)
- c) Schwere Blutungen durch Leberzellschaden
- d) Krämpfe mit Atemstillstand (cerebrale Schädigung)
- e) Leberinsuffizienz, Coma

2. Die leichteren Formen der Galaktosämie zeigen eine latente Symptomatik. Die Kinder sind dystroph und weisen bald einen physischen, meist auch psychischen Entwicklungsrückstand auf. Im Gegensatz zur akuten schweren Form der Erkrankung bildet sich eine Leberzirrhose nur langsam oder auch gar nicht aus; Katarakte und geistige Retardierung treten bei diesen Patienten selten auf.

3. Bei der subklinisch, inapparenten Form der Galaktosämie äußert sich die Krankheit in einer Abneigung oder Unverträglichkeit von

Milch und Milchprodukten und wird oft fälschlicherweise als sogenannte Milchallergie diagnostiziert. Durchfälliger Stuhl und Leibschmerzen nach Milchgenuß sind charakteristisch.

Weitere Laborbefunde zur Galaktosämie:

Bei der Untersuchung des Urins galaktosämischer Patienten wird die Reduktionsprobe (z.B. Fehling) positiv ausfallen. Zudem ist auch eine Aminoacidurie nachzuweisen.

Vor allem liefert die Untersuchung des Blutes deutliche Hinweise auf Galaktosämie: physiologischerweise liegt der Blutgalaktosespiegel zwischen 5 mg/100 ml und 30 mg/100 ml. Galaktosämische Kinder dagegen weisen Werte bis zu 100 mg/100 ml auf.

Zur Diagnose des Gal-1-PUT-Defektes haben sich Enzymaktivitätsuntersuchungen in den Erythrozyten bewährt. Sogenannte Screeningtests (Beutler und Mitarbeiter) ⁽²⁾ sind relativ leicht durchführbar, liefern allerdings nur qualitative Ergebnisse. ⁽²⁵⁾ Mit Hilfe des "Guthrie-Tests", einem mikrobiologischen Hemmtest mit galaktosesensitivem, mutiertem Escheria-Coli-Stamm, wird die erhöhte Galaktose, nicht der Enzymdefekt selbst, nachgewiesen. Ebenfalls existiert ein quantitativer

Nachweistest mit radioaktiv markierter Gal-1-C¹⁴.

Als weitere Diagnosemöglichkeit sollte noch die Galaktosebelastung genannt werden. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist allerdings eingeschränkt, da es bei den Patienten zu Hypoglykämien kommen kann, vor allem bei oraler, weniger bei i.v. Belastung.

Therapie bei Galaktosämie

Bei Verdacht auf Galaktosämie muß das Kind unverzüglich galaktosefrei ernährt werden. Bis zum endgültigen Enzymbefund können folgende milchzuckerfreie Präparate verabreicht werden: auf Sojabasis existieren u. a. die Präparate Lactopriv[®], Solactin[®] und Sojabasan[®]. Ebenfalls eignen sich reine Maisstärkepräparate (Maizena[®], Mondamin[®], Almidin[®]) und Trockenschleimpräparate (Aponti[®]-Dreikorn, Gerber[®]-Haferschleim).

Neben diesen Fertigpräparaten haben sich früher die "Freudenberg'sche Eiersuppe" und der "Moll'sche Keks- und Reispudding" bewährt, die derzeit allerdings nicht mehr gegeben werden.

Anzumerken ist hier, daß eine galaktosefreie Ernährung keine cerebralen Schäden setzt, wie früher angenommen wurde; die Synthese der Galaktolipide ist auch ohne orale Galaktosezufuhr gewährleistet. (31)

Prognose

Galaktosämische Kinder gedeihen körperlich und geistig normal, wenn sie sofort auf galaktosefreie Kost gesetzt werden. Die Aussichten sind um so besser, je früher mit der Diät begonnen wird. Wichtig ist, daß schon eine transplazentare Schädigung der Frucht eintreten kann. ⁽²⁴⁾ Deshalb sollte die heterozygote Mutter eines galaktosämischen Kindes bei erneuter Schwangerschaft jeglichen Milchgenuß vermeiden. Ebenfalls gilt dies natürlich für galaktosämische Frauen bzw. Partnerinnen von männlichen Galaktosämikern.

Über die Dauer der milchzuckerfreien Ernährung lassen sich noch keine genauen Angaben machen, jedoch sollte die Diät zumindest bis zum Abschluß des Wachstums und der geistigen Entwicklung eingehalten werden.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß einige Galaktosämiker in fortgeschrittenem Alter milchzuckerhaltige Nahrung vertragen. Exogene Galaktose kann dann sehr wahrscheinlich über einen Umgehungsabbauweg metabolisiert werden. Der sogenannte "Doudoroff-Abbauweg"⁽²³⁾ konnte durch C u a t r e c a s a s und S e g a l ^(7/8) auch bei galaktosämischen Patienten nachgewiesen werden.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Fragestellung

Der Gal-1-PUT-Defekt als Ursache der Galaktosämie zeichnet sich durch seine unterschiedliche Schwere aus. Bei den Homozygotkranken, die einen schweren Krankheitsverlauf aufweisen können, fehlt die Aktivität der Gal-1-PUT, bei Heterozygoten ohne klinische Symptomatik ist die Aktivität des Enzyms um ungefähr 50% des Normalwertes reduziert. Es gibt auch Probanden als Träger der sogenannten "Duarte-Variante", die erstmals 1965 von Beutler⁽⁴⁾ beschrieben wurde. Bei Heterozygoten dieser Variante entspricht die Aktivität der Gal-1-PUT etwa 75%, bei Homozygoten ca. 50% der Norm. Letztere sind also nach dem Enzymbefund nicht von den Heterozygotkranken der klassischen Galaktosämie zu unterscheiden und gehen somit in die Genfrequenzberechnungen ein.

Die Aufgabe war nun, die Gal-1-PUT-Aktivität in den Erythrozyten westungarischer Probanden zu bestimmen, um anhand der pathologischen Werte die Genfrequenz für diesen Enzymdefekt festzustellen, vor allem im Zigeunerisolat Bucsu,

wo durch Konsanguinität unter Umständen eine höhere Frequenz erwartet werden konnte als bei den Blutspendern aus dem Bezirk Vas, die als Vergleichskollektiv dienten.

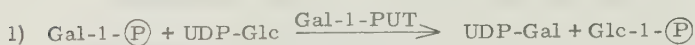
Die Frage in dieser Arbeit lautete, ob die autosomal rezessiv vererbte Galaktosämie in einer relativ homogenen Bevölkerung häufiger vererbt wird als in einer stark durchmischten. So wurde in dieser Arbeit auf der einen Seite die Enzymaktivität der Gal-1-PUT der homogenen Bevölkerung des engumschriebenen Isolats Bucsú bestimmt, andererseits die Enzymaktivität einer heterogenen Population Westungarns gemessen. Es war zu vermuten, daß sich innerhalb der homogenen Bevölkerung mehr pathologische Werte finden würden, als bei einer heterogenen, was folglich zu unterschiedlichen Ergebnissen in den Genfrequenzen führen müßte.

2.2. Probandengut und Methodik

In der Zeit zwischen April und Juni 1974 wurde insgesamt 674 Probanden Westungarns Venenblut entnommen und per Express über Österreich zur Untersuchung nach Erlangen versandt. 303 Spender kamen aus dem Bezirk B u c s u , die restlichen 371 Probanden Westungarns setzten sich aus Blutspendern des Bezirks V a s , retardierten Kindern eines Heimes, Zwillingen und einigen an Hepatitis Erkrankten zusammen. Innerhalb der zweiten Gruppe wurde auf eine weitere Aufteilung verzichtet.

Für diese Untersuchungen wurde nach Vorschrift der Firma SIGMA der modifizierte UDP-Glc-Konsumptions-test nach B e u t l e r ⁽³⁾ angewandt, der im wesentlichen auf der spektrophotometrischen Technik nach A n d e r s o n , K a l c k a r , K u r a h a s h i und I s s e l b a c h e r beruht. ^(1/15) Diese Methode erlaubt die exakte Bestimmung der Gal-1-PUT-Aktivität im Erythrozytenhämolysat. So ist es möglich, Homozygotkranke gegen Heterozygotkranke und Träger der "Duarte-Variante" ausreichend genau abzugrenzen.

Man bedient sich zweier Reaktionssysteme, in deren Verlauf der Umsatz an UDP-Glc ein Maß für die Aktivität der Gal-1-PUT wird.



Durch Kochen wird das Enzym Gal-1-PUT zerstört; somit ist die Reaktion 1) unterbrochen. Das verbliebene Substrat UDP-Glc wird in einer zweiten Reaktion umgesetzt, indem man UDP-Glc-Dehydrogenase und das Coenzym NAD hinzufügt.



Gemessen wird nun Anfangs- und Endextinktion dieser Reaktion vor und nach halbstündiger Inkubation; daraus wird die Differenz ΔE_1 gebildet. Im Verlauf der Reaktion wird NAD zu NADH reduziert. Da NADH im Gegensatz zu NAD bei einer Wellenlänge von 366 nm eine sehr hohe Absorption besitzt, kann die Extinktionsänderung als Maß für den Verbrauch an UDP-Glc gelten.

Als Bezugssystem dient eine zweite Meßreihe, die der ersten in ihrer Durchführung entspricht. Im Gegensatz zur Reaktion 1) enthält dieses vergleichende zweite System jedoch kein Gal-1-(P), sondern Aqua bidest, sodaß vorerst kein UDP-Glc umgesetzt werden kann.



Erst nach Zugabe der UDP-Glc-Dehydrogenase und NAD wird die Reaktion gestartet, d.h. UDP-Glc verbraucht. Wieder werden Anfangs- und Endextinktion gemessen und die Differenz ΔE_2 gebildet. Der Vergleich der Extinktionsänderungen ΔE_1 und ΔE_2 ergibt eine Differenz zugunsten von ΔE_2 , die nun ein Maß für die Aktivität der Gal-1-PUT in der Reaktion 1) darstellt.

Die Aktivität der Gal-1-PUT im Erythrozytenhämolystat wird in Einheiten (= Units) gemessen. Nach Beutler entspricht "eine Einheit der Enzymmenge, die in einer Stunde bei 37°C 1 Mol UDP-Glc umsetzt". (3)

Schema des Versuchablaufs

A) Venenblut + ACD-Stabilisator



B) Erythrozyten + physiol. NaCl-Lösung



C) Gewaschene Erythrozyten + Aqua bidest



Hämolysat + Transformationslösung



Extinktionsmessung



Ansatz 1 (Meßwert)

Hämolysat
+ UDP-Glc-Glycin
+ Gal-1-P



klarer Überstand
+ Puffer + NAD + H₂O



Meßansatz
+ UDP-Glc-Dehydrogenase



1. Extinktionsmessung



2. Extinktionsmessung

Ansatz 2 (Leerwert)

Hämolysat
+ UDP-Glc-Glycin
+ Aqua bidest



klarer Überstand
+ Puffer + NAD + H₂O



Meßansatz
+ UDP-Glc-Dehydrogenase



1. Extinktionsmessung



2. Extinktionsmessung

Untersuchungsgang:

ad A) Herstellen des Hämolysats

Den Probanden wurde 2,0 ml Venenblut auf
0,5 ml ACD-Stabilisator entnommen.

Zusammensetzung des ACD-Stabilisators:

4,7 g Zitronensäure

16,0 g Trinatriumzitat

25,0 g Glukose

Aqua bidest ad 1000 ml

Die Blutproben wurden an der ungarisch-
österreichischen Grenze übergeben und per
Express nach Erlangen geschickt, sodaß sie
zwei Tage nach Abnahme dort eintrafen.

ad B) Waschen der Erythrozyten

500 Mikroliter des Blutes wurden in ein Plastik-
röhrchen pipettiert, mit ca. 5 ml physiologischer
Kochsalzlösung versetzt und 5 Minuten zentrifugiert
(bei 2000 U/min). Der Überstand wird abgesaugt,
die Erythrozyten werden wiederum mit physiolo-
gischer NaCl-Lösung aufgefüllt und zentrifugiert.
Das wiederholt man ein drittes Mal, sodaß nun
die Erythrozyten sorgfältig gewaschen sind.

ad C) Einfrieren der gewaschenen Erythrozyten

Man verdünnt die gewaschenen Erythrozyten mit 0,65 ml Aqua bidest. Nach Mischen auf dem Rüttler (Eppendorff) werden sie bei -20°C eingefroren. Dadurch wird die Hämolyse vermindert, nicht aber die Aktivität des Enzyms. Nicht vor 30 Minuten werden die Proben wieder aufgetaut und 5 Minuten zentrifugiert. So wird das Hämolysat vom Erythrozytenstroma abgesondert.

Hämoglobinbestimmung:

Der Hämoglobingehalt des Hämolysats wird nach der modifizierten Methode von D r a b k i n bestimmt.⁽²⁷⁾

0,05 ml Hämolysat werden in 5 ml Transformationslösung pipettiert und gut durchmischt.

Zusammensetzung der Transformationslösung:

1,0 g Na-hydrogencarbonat

0,2 g K-ferrocyanid

0,05 g K-cyanid

Aqua bidest ad 1000 ml

Frühestens nach 5 Minuten wird die Extinktion im Eppendorff-Photometer gegen Wasser gemessen.

Die Extinktionsmessung wird mit Makroküvette
(d = 1 cm) und großer Blende bei einer Wellenlänge
von 546 nm vorgenommen. Der Extinktionskoeffizient
des Hämoglobins beträgt 11000, das Molekular-
gewicht 16114.

Man erhält den Hämoglobingehalt des Hämolysats in
g/ml durch Multiplizieren der Extinktion mit 0,148.

$$\text{gHb} /_{\text{ml}} = 0,148 \times \text{Ext.}_{\text{Hb}}$$

Aktivitätsbestimmung der Gal-1-PUT:

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

- | | |
|------------------------------------|--|
| * Glycinpuffer | 1 M, pH = 8,7 |
| * UDP-Glc-Na-Salz | 25 mg in 5 ml Aqua bidest |
| * UDP-Glc-Glycin-
Mischung | 0,2 ml Glycinpuffer
+ 0,05 ml UDP-Glc-Lösung |
| * Gal-1 - P | 30 mg in 10 ml Aqua bidest |
| * UDP-Glc-Dehydro-
genase | gebrauchsfertige Lösung |
| ** NAD | 500 mg in 30 ml Aqua bidest
mit NaOH Einstellen auf pH7
ad 50 ml Aqua bidest |
| * Substanzen der Firma SIGMA | |
| ** Substanzen der Firma Boehringer | |

Herstellen des Ansatzes:

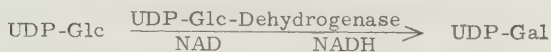
Zu 0,1 ml der UDP-Glc-Glycinmischung werden 0,05 ml der Gal-1-(P)-Lösung in ein Zentrifugengefäß pipettiert. In einem zweiten werden 0,1 ml der gleichen Glycinmischung mit 0,05 ml Aqua bidest versetzt. Möglichst schnell werden nun in beide Röhrchen jeweils 0,1 ml desselben Hämolyats in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert.



Nach genau 15 Minuten werden die beiden Ansätze aus dem Wasserbad genommen und mit 0,5 ml eiskaltem Wasser aufgefüllt. Anschließend werden die Proben unverzüglich in ein kochendes Wasserbad gestellt, wodurch die Reaktion durch Enteiweißung zum Stillstand kommt. Nach exakt 2 Minuten werden die Ansätze dann für 10 Minuten in einem Eisbad abgekühlt und 5 Minuten zentrifugiert. Koagulum und klarer Überstand trennen sich scharf.

0,2 ml des Überstandes aus dem Ansatz 1 werden nun in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 0,15 ml Glycinpuffer, 0,1 ml NAD und 0,45 ml Aqua bidest versetzt.

Analog verfährt man mit 0,2 ml des Überstandes aus dem Ansatz 2. Durch Zugabe von 0,1 ml UDP-Glc-Dehydrogenase wird die Reaktion erneut gestartet, bei der UDP-Glc umgesetzt und NAD zu NADH reduziert wird.



Folgende Arbeitsgänge im Abstand von jeweils

15 Sekunden werden nun durchgeführt:

- a) Starten der Stoppuhr: Ansatz 1
 + 0,1 ml UDP-Glc-Dehydrogenase
- b) Nach 15 Sekunden: Ansatz 2
 + 0,1 ml UDP-Glc-Dehydrogenase
- c) Nach 30 Sekunden: Gerüttelter Ansatz 1
 in die Halbmikroküvette
- d) Nach 45 Sekunden: Gerüttelter Ansatz 2
 in die Halbmikroküvette
- e) Nach 60 Sekunden: Messung der Anfangs-
 extinktion des Ansatzes 1
- f) Nach 75 Sekunden: Messung der Anfangs-
 extinktion des Ansatzes 2
- g) Inkubation von Ansatz 1 und Ansatz 2 für
 30 Minuten
- h) Messung der Endextinktion von Ansatz 1
 und Ansatz 2

Die photometrischen Messungen wurden in einem Eppendorff-Spektrallinienphotometer mit großem Tubus, mittlerer Blende bei einer Wellenlänge von 366 nm vorgenommen. Die Halbmikroküvette hatte eine Schichtdicke von 1 cm und wurde durch einen temperierbaren Küvettenhalter bei 37°C konstant erwärmt. Der Nullpunkt wurde gegen Luft eingestellt.

2.3. Berechnung der Aktivität der Gal-1-PUT

$$U = \frac{\Delta E_2 - \Delta E_1}{g \text{ Hb} / \text{ml}} \times 12,9$$

ΔE_1 = Extinktionsänderung des Meßwertes

ΔE_2 = Extinktionsänderung des Leerwertes

$g \text{ Hb} / \text{ml}$ = Hämoglobingehalt des Hämolysats

U = Enzymaktivität in Einheiten (= Units)

2.4. E r g e b n i s s e

2.4.1. Normalwerte und Altersverteilung der

Gal-1-PUT-Aktivität bei Gesunden

Es sollen die Normalwerte der Gal-1-PUT-Aktivität der Probanden des Isolats B u c s u und einer heterogenen Bevölkerungsgruppe Westungarns gegenübergestellt werden.

Insgesamt standen 653 Blutspender mit normalen Enzymwerten für die Gal-1-PUT zur Verfügung; davon entfielen 295 auf den Bezirk Bucsú und 358 auf die Vergleichsgruppe.

Zur Untersuchung auf Altersabhängigkeit wurden die Probanden in sieben Altersklassen eingeteilt, für die dann jeweils Mittelwert, mittlere Streubreite, Minimum und Maximum der Gal-1-PUT-Aktivität berechnet wurden.

Die Altersklassen:

A = 3 - 6 Jahre

B = 7 - 13 Jahre

C = 14 - 18 Jahre

D = 19 - 30 Jahre

E = 31 - 45 Jahre

F = 46 - 60 Jahre

G = 61 - 80 Jahre

Es soll noch darauf hingewiesen werden, daß bei den

Blutspendern aus Bucsu die Altersklassen A und B nicht vertreten sind. Innerhalb der zweiten Gruppe fehlen Probanden, die älter als 60 Jahre sind.

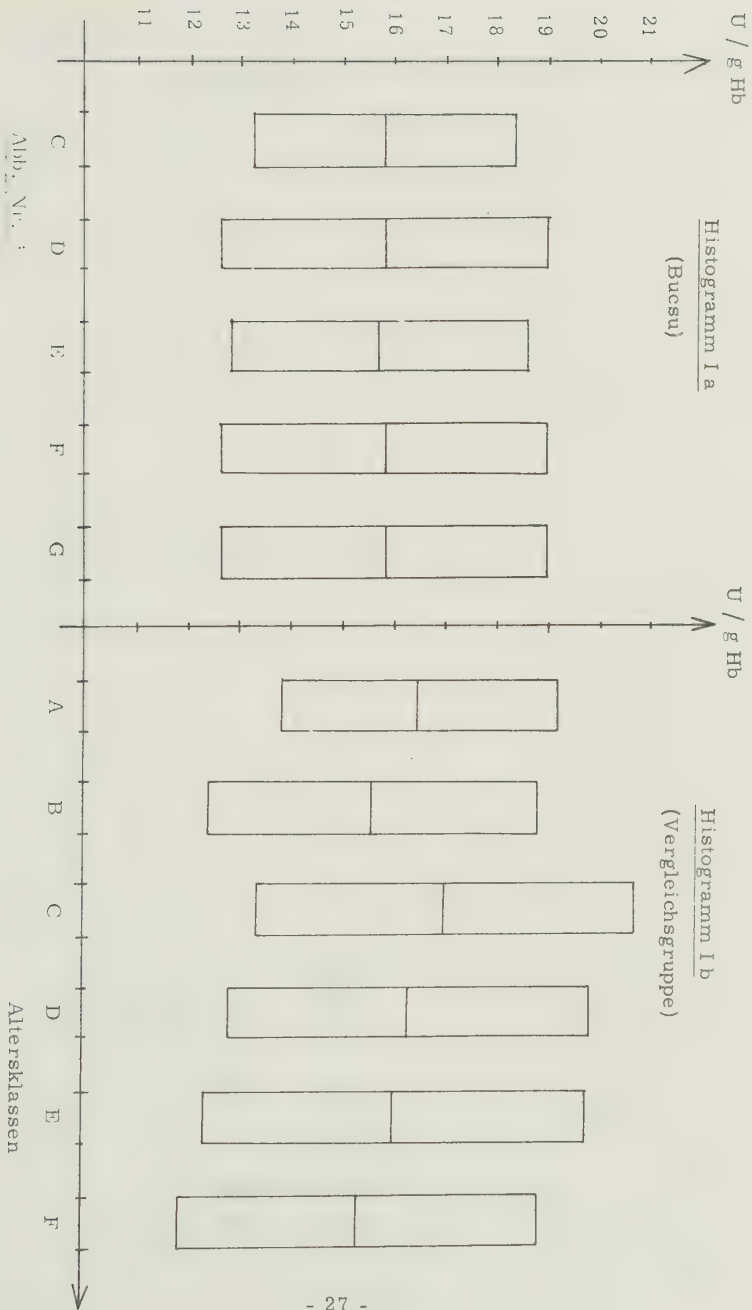
Tabelle I a (Bucsu)

Alters- klasse	Mittelwert $\pm 1\sigma$	Minimum	Maximum
C	$15,8 \pm 2,6$	13,2	20,8
D	$15,8 \pm 3,2$	13,3	19,4
E	$15,7 \pm 2,9$	13,4	20,5
F	$15,8 \pm 3,2$	13,2	20,8
G	$15,8 \pm 3,2$	13,3	24,6

Tabelle I b (Vergleichsgruppe)

Alters- klasse	Mittelwert $\pm 1\sigma$	Minimum	Maximum
A	$16,5 \pm 2,7$	15,9	17,7
B	$15,6 \pm 3,2$	13,1	23,0
C	$17,0 \pm 3,7$	13,2	22,4
D	$16,3 \pm 3,5$	13,1	24,3
E	$16,0 \pm 3,7$	13,1	21,7
F	$15,3 \pm 3,5$	13,3	23,0

Aus den Tabellen wie auch aus dem folgenden Histogramm ist ersichtlich, daß die gefundenen Enzymwerte gegen eine Altersabhängigkeit der Gal-1-PUT-Aktivität jenseits der ersten beiden Lebensjahre sprechen.

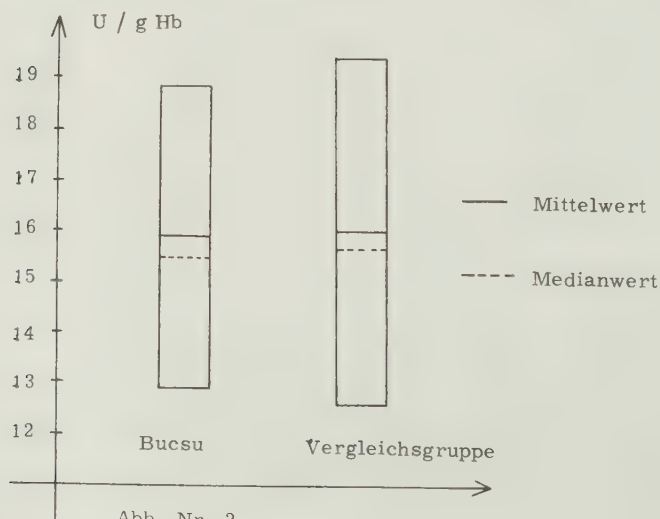


Da keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Altersklassen festzustellen waren, sollen nun die Ergebnisse für Bucsú und die Vergleichsgruppe ohne Berücksichtigung des Alters zusammengefaßt werden. In der folgenden Abbildung Nr. 2 findet eine weitere Größe, der Medianwert, Berücksichtigung. In diese Kenngröße gehen sowohl die Häufigkeit als auch die Variationsbreite der gefundenen Einzelwerte mit ein.

Tabelle II

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Medianwert
Bucsú	$15,9 \pm 3,0$	13,2	24,6	15,5
Vergleichsgruppe	$16,0 \pm 3,4$	13,1	24,3	15,7

Histogramm II



2.4.2. Überprüfung des Verteilungstyps der Gal-1-PUT-Aktivität

Im folgenden Abschnitt sollen die gefundenen Enzymwerte auf die Art der Verteilung überprüft werden. Sämtliche Normalwerte, die zwischen 13,1 U / g Hb und 24,6 U / g Hb schwankten, werden ihrer Größe nach geordnet und in Klassen eingeteilt, die sich um jeweils 1 U / g Hb unterscheiden. Die pathologischen Werte, die kleiner als 12 U / g Hb sind, werden hierbei nicht weiter aufgegliedert, sondern als Summe insgesamt berücksichtigt.

Tabelle III a (Bucu)

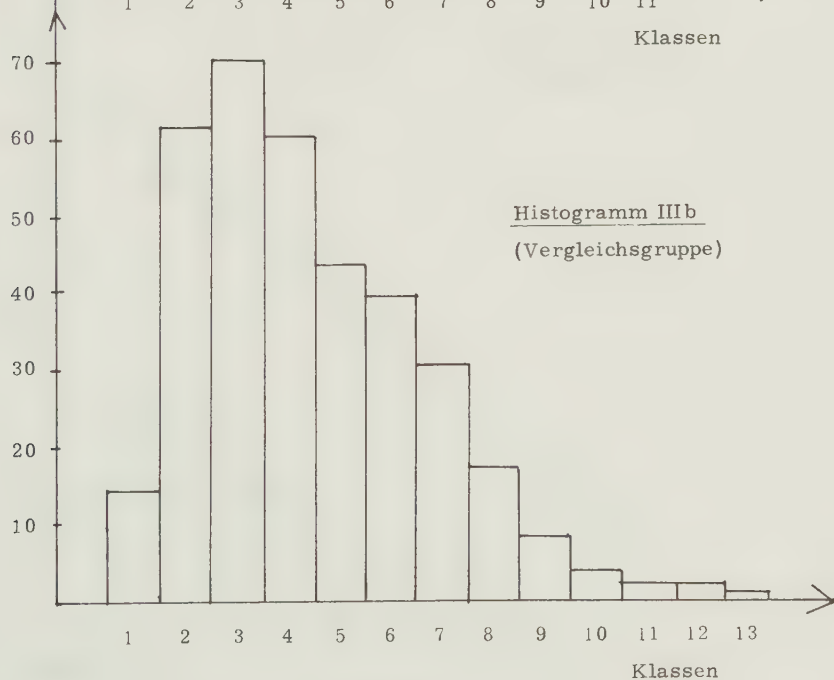
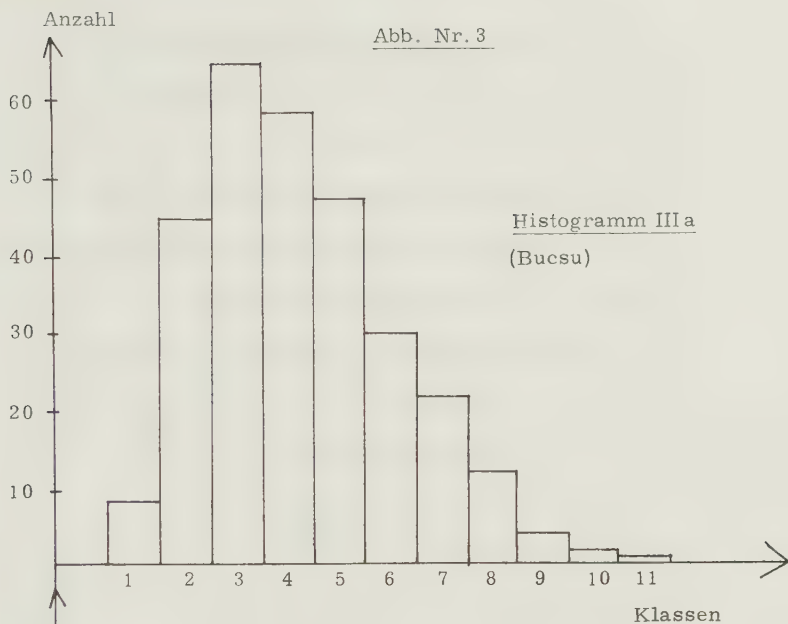
Klasse	Gal-1-PUT-Aktivität	Anzahl	kumulative Häufigkeit	relative kumulative Häufigkeit
1	unter 12,0	8	8	2,71 %
2	13,0 - 13,9	45	53	18,00 %
3	14,0 - 14,9	65	118	40,00 %
4	15,0 - 15,9	59	177	60,00 %
5	16,0 - 16,9	47	224	75,90 %
6	17,0 - 17,9	30	254	88,10 %
7	18,0 - 18,9	22	276	93,60 %
8	19,0 - 19,9	12	288	97,60 %
9	20,0 - 20,9	4	292	99,00 %
10	21,0 - 21,9	2	294	99,70 %
11	über 22,0	1	295	100,00 %

Tabelle III b (Vergleichsgruppe)

Klasse	Gal-1-PUT-Aktivität	Anzahl	kumulative Häufigkeit	relative kumulative Häufigkeit
1	unter 12,0	13	13	3,65 %
2	13,0 - 13,9	62	75	20,95 %
3	14,0 - 14,9	72	147	41,06 %
4	15,0 - 15,9	62	209	58,38 %
5	16,0 - 16,9	44	253	70,67 %
6	17,0 - 17,9	40	293	81,84 %
7	18,0 - 18,9	31	324	90,50 %
8	19,0 - 19,9	17	341	95,25 %
9	20,0 - 20,9	8	349	97,48 %
10	21,0 - 21,9	4	353	98,60 %
11	22,0 - 22,9	2	355	99,16 %
12	23,0 - 23,9	2	357	99,72 %
13	über 24,0	1	358	100,00 %

Graphische Darstellung der Häufigkeit (Anzahl) der

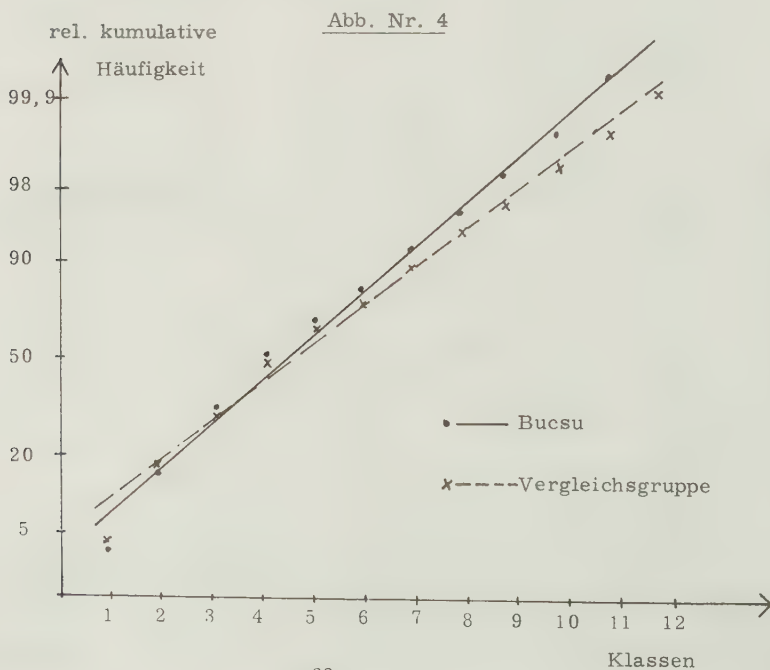
Enzymwerte in den einzelnen Klassen:



Die Histogramme IIIa und IIIb zeigen, daß die Einzelwerte der Gal-1-PUT-Aktivität einer Normalverteilung folgen.

Als Bestätigung dieser Behauptung dient eine weitere graphische Darstellung, in der die relative kumulative Häufigkeit in den einzelnen Klassen betrachtet wird.

Die Abszisse ist linear geteilt, die Ordinate nach dem Gauß'schen Integral. Da sich sowohl für Bucsú als auch für die Vergleichsgruppe eine Gerade ergibt, ist bewiesen, daß die Gal-1-PUT-Werte eine Gauß'sche Normalverteilung zeigen.



2.4.3. Die Gal-1-PUT-Aktivität bei Heterozygoten und Zwillingen

Insgesamt konnten bei diesen Untersuchungen

21 Patienten mit pathologischen Gal-1-PUT-Werten

festgestellt werden, wobei 8 auf Probanden des Bezirks

Bucsu und 13 auf die Vergleichsgruppe entfielen.

Die acht heterozygoten Probanden aus Bucsu hatten

folgende Enzymwerte:

3,0 ; 4,1 ; 6,0 ; 7,4 ; 7,7 ; 10,2 ; 10,2 ; 11,2

Es wurden also fünf heterozygote Genträger und drei

Genträger der "Duarte-Variante" gefunden.

Als Mittelwert errechnet sich für die heterozygoten

Galaktosämiker eine Enzymaktivität von $5,7 \pm 2,7 \text{ U / g Hb}$,

für die "Duarte-Variante" $10,5 \pm 0,7 \text{ U / g Hb}$.

Bei den 13 Heterozygoten der Vergleichsgruppe

wurden folgende Werte ermittelt:

6,5 ; 6,6 ; 6,8 ; 7,0 ; 7,6 ; 8,0 ; 8,8 ; 9,2 ; 9,2 ;

9,5 ; 10,0 ; 10,2 ; 10,4

Auch hier fanden sich keine Homozygotkranken.

Als Mittelwert ergibt sich für die neun Hetero-

zygoten eine Gal-1-PUT-Aktivität von $7,7 \pm 1,8 \text{ U / g Hb}$,

für die "Duarte-Variante" $10,0 \pm 0,7 \text{ U / g Hb}$.

In der folgenden Tabelle seien die Ergebnisse noch einmal zusammenfassend gegenübergestellt:

	Mittelwert bei Heterozygoten	Mittelwert für die "Duarte-Variante"
Bucsu	$5,7 \pm 2,7$	$10,5 \pm 0,7$
Vergleichs- gruppe	$7,7 \pm 1,8$	$10,0 \pm 0,7$

Anzumerken ist, daß sämtliche Werte unter 13,5 U / g Hb doppelt, teilweise auch dreifach bestimmt wurden, um die Richtigkeit der gefundenen pathologischen Werte sicherzustellen.

Ergebnisse bei Zwillingen

Bei diesen Untersuchungen wurde die Gal-1-PUT-Aktivität von 45 Zwillingspaaren bestimmt. Die statistische Auswertung der Enzymwerte brachte die gleichen Ergebnisse wie die der Vergleichsgruppe, sodaß sie zusammengefaßt aufgeführt werden konnten.

Als Besonderheit lagen bei den Zwillingen die Ergebnisse der Blutgruppenbestimmungen vor; die Übereinstimmung bei 16 Zwillingspaaren ließ darauf schließen, daß es sich hier um eineiige Zwillinge handelte, deren Enzymaktivität gleich groß hätte sein müssen.

Folgende Enzymwerte wurden bei eineiigen

Zwillingen gefunden:

Tabelle IV

Zwillinge	Blutgruppenbestimmung	Gal-1-PUT-Aktivität
31/1/2	A ₁ P ₁ MN D. C ^w . ee	15,5/13,5
32/1/2	A ₁ P ₁ MN D. C ^w . ee	15,2/14,2
33/1/2	A ₁ P ₁ ⁻ MN D. Cc ee C ^{w-}	14,6/15,0
37/1/2	A ₁ P ₁ ⁻ MN D. Cc ee C ^{w-}	15,1/15,3
42/1/2	A ₁ NN D. Cc Ee C ^{w-}	13,1/13,3
46/1/2	O MN D. CC ee C ^{w-}	13,1/13,7
48/1/2	O MN D. CC ee C ^{w-}	15,7/17,2
56/1/2	A ₁ MM dd cc ee C ^{w-}	13,2/13,9
58/1/2	B P ₁ [*] NN D. Cc ee C ^{w-}	9,2/ 6,8
59/1/2	B P ₁ [*] NN D. Cc ee C ^{w-}	12,4/10,4
60/1/2	A ₁ P ₁ [*] MN D. CC ee C ^{w-}	14,1/13,3
61/1/2	A ₁ B P ₁ [*] MMD. Cc ee C ^{w-}	15,9/16,0
65/1/2	A ₁ P ₁ ⁻ MN D. Cc ee C ^{w-}	16,0/14,3
67/1/2	A ₁ P ₁ ⁻ MN dd cc ee C ^{w-}	16,5/16,1
68/1/2	A ₁ B P ₁ [*] MM D. Cc ee C ^{w-}	14,7/14,8
71/1/2	B P ₁ [*] MN D. Cc Ee C ^{w-}	15,6/13,8

Die Tabelle IV zeigt, daß die Übereinstimmung in den Enzymwerten der Zwillinge mit einer durchschnittlichen Abweichung von 1 U / g Hb sehr groß ist. Dies bedeutet, daß es sich bei dem hier angewandten UDP-Glc-Konsumptionstest um eine für klinische Zwecke gut verwertbare Methode zur Bestimmung der Gal-1-PUT-Aktivität im Erythrozytenhämolysat handelt. Unterstützt wird dies durch ein Ergebnis bei Drillingen, von denen zwei die gleiche Blutgruppe haben.

Tabelle V

Drillinge	Blutgruppenbestimmung	Gal-1-PUT-Aktivität
38/1/2	O P ₁ ⁺ NN D. Cc ee C ^{W-}	17,2/17,3
38/3	O P ₁ ⁺ MMD. Cc ee C ^{W-}	23,0

2.4.4. Berechnung der Genfrequenzen

nach dem "Hardy - Weinberg - Gesetz"

$$p = \frac{2 AA + Aa + aa}{2(AA + Aa + aa)} \quad q = \frac{2 aa + Aa}{2(AA + Aa + aa)}$$

p = Genhäufigkeit für Gesunde

q = Genhäufigkeit für Kranke

AA = Gesunde

Aa = Heterozygote Genträger

aa = Homozygotkranke

Als Heterozygotenfrequenz ergibt sich das doppelte Produkt aus Genhäufigkeit für Gesunde und Kranke.

$$f_{he} = 2 p q$$

Die Homozygotenfrequenz ist:

$$f_{ho} = (2 p q)^2 \times 4$$

Die Genfrequenzen für Bucsú ohne Berücksichtigung der Genträger der "Duarte-Variante":

$$AA = 287 \quad Aa = 5 \quad aa = 0$$

$$p = \frac{2 \times 287 + 5}{2 (287 + 5)} = 0,991$$

$$q = \frac{5}{2 (287 + 5)} = 0,0086$$

$$f_{he} = 0,017 \quad \longrightarrow \quad 1 : 59$$

1 : 60

$$f_{ho} = 0,000072 \quad \longrightarrow \quad 1 : 13928$$

1 : 14000

Die Genfrequenz für die "Duarte-Variante" in Bucsú:

$$AA = 287 \quad Aa = 3 \quad aa = 0$$

$$p = \frac{2 \times 287 + 3}{2 (287 + 3)} = 0,994$$

$$q = \frac{3}{2 (287 + 3)} = 0,0052$$

$$f_{he} = 0,01 \quad \longrightarrow \quad 1 : 97$$

1 : 100

$$f_{ho} = 0,000027 \quad \longrightarrow \quad 1 : 37736$$

1 : 38000

Die Genfrequenzen für die Vergleichsgruppe ohne Berücksichtigung der "Duarte-Variante":

$$AA = 358 \quad Aa = 8 \quad aa = 0$$

$$p = \frac{2 \times 358 + 8}{2 (358 + 8)} = 0,989$$

$$q = \frac{8}{2 (358 + 8)} = 0,0109$$

$$f_{he} = 0,021 \longrightarrow 1 : 48$$

1 : 50

$$f_{ho} = 0,000118 \longrightarrow 1 : 9216$$

1 : 9000

Die Genfrequenz für die "Duarte-Variante" in der Vergleichsgruppe:

$$AA = 358 \quad Aa = 4 \quad aa = 0$$

$$p = \frac{2 \times 358 + 4}{2 (358 + 4)} = 0,995$$

$$q = \frac{4}{2 (358 + 4)} = 0,00552$$

$$f_{he} = 0,011 \longrightarrow 1 : 91$$

1 : 90

$$f_{ho} = 0,00003 \longrightarrow 1 : 33124$$

1 : 33000

Zusammenfassung der Genfrequenzen für den

Gal-1-PUT-Defekt:

Tabelle VI

	Heterozygote	Homozygote	Genfrequenz
1) Bucsü	1 : 59	1 : 13928	0,0085
Vergleichs- gruppe	1 : 48	1 : 9216	0,0104
2) Bucsü	1 : 97	1 : 37736	0,0052
Vergleichs- gruppe	1 : 91	1 : 33124	0,0055

1) ohne Berücksichtigung der "Duarte-Variante"

2) für die "Duarte-Variante"

3. Diskussion

Die Galaktosämie ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, deren Ursache in der fehlenden oder auch verminderten Aktivität der Gal-1-PUT begründet ist. Mit Hilfe des UDP-Glc-Konsumptionstests nach Beutler kann die Enzymaktivität im Erythrozytenhämolysat quantitativ erfaßt werden, sodaß es möglich wird, Normalwerte für Gesunde und auch für Heterozygote zu ermitteln. In dieser Arbeit wurden zwei Populationen gegenübergestellt: Beim Bezirk Bucsú handelt es sich um ein Reservat mit relativ homogener Bevölkerung, die Vergleichsgruppe stammt aus einem relativ großen Gebiet Westungarns mit einer heterogenen Bevölkerung.

Als Normalwerte für Gesunde errechnet sich für Bucsú eine durchschnittliche Enzymaktivität von $15,9 \pm 3,0 \text{ U / g Hb}$, für die Vergleichsgruppe $16,0 \pm 3,4 \text{ U / g Hb}$. Diese Ergebnisse stimmen annähernd mit Werten überein, die H s i a⁽¹⁴⁾ und M e l l m a n⁽²⁴⁾ bei ihren Untersuchungen fanden.

Andere Veröffentlichungen von Beutler⁽³⁾
und McGuiness⁽¹²⁾ liegen dagegen um etwa
4 U / g Hb über den hier ermittelten Gal-1-PUT-
Werten, da sie eine etwas andere Methode ver-
wendeten.

Tolstrup⁽³⁵⁾ fand bei seinen Messungen um
75% höhere Enzymwerte. Diese große Abweichung
ist damit zu erklären, daß hier mit einer modifi-
zierten Methode gearbeitet wurde. Tolstrup ver-
wendete bei kurzen Inkubationszeiten hohe Substrat-
und geringe Hämolyssatzkonzentrationen.

Durchschnittswerte der Gal-1-PUT-Aktivität

in U / g Hb:

Hsia	Mellman	Beutler	McGuiness
15,2 ± 3,5	17,2 ± 1,5	19,2 ± 1,0	19,35 ± 4,6

Tolstrup

28,25 ± 3,5

Eigene Untersuchungen:

Bucsu 15,9 ± 3,0 Vergleichsgruppe 16,0 ± 3,4

Heterozygotkranke Galaktosämiker weisen eine um
50% herabgesetzte Aktivität der Gal-1-PUT auf.

Für diese Kranken wurde in Bucsú ein Mittelwert von $5,7 \pm 2,7$ U / g Hb ermittelt, für die Heterozygoten der Vergleichsgruppe ergab sich eine durchschnittliche Enzymaktivität von $7,7 \pm 1,8$ U / g Hb. Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen von S i t z m a n n und K a l o u d ⁽¹⁷⁾, die bei Heterozygotkranken Enzymwerte von $6,6 \pm 2,4$ U / g Hb für die Gal-1-PUT-Aktivität fanden.

Die Genfrequenzen für den Gal-1-PUT-Defekt differieren in der Literatur sehr stark. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen entsprechen den Angaben, die K a l o u d ⁽¹⁹⁾ über die Genfrequenz von Galaktosämikern in der Steiermark macht. Andere Autoren fanden bei ihren Versuchsreihen eine geringere Anzahl galaktosämischer Patienten, sodaß sie zu kleineren Genfrequenzen kamen.

In der folgenden vergleichenden Übersicht sind die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse denen früherer Untersuchungen gegenübergestellt:

	Gen- frequenz	Heterozygoten- frequenz	Homozygoten- frequenz
Bucusu	0,0085	1 : 59	1 : 14000
Vergleichs- gruppe	0,0104	1 : 48	1 : 9300
Steiermark (Kaloud) (19)	0,0092	1 : 55	1 : 12100
Michigan (Hansen) (13)	0,0075	1 : 67	1 : 17000
Kopenhagen (Brandt) (5)	0,0074	1 : 68	1 : 19000
Kalifornien (Beutler) (4)	0,0063	1 : 80	1 : 25000
Wien (34) (Thalhammer)	0,0061	1 : 82	1 : 27000
Franken (Sitzmann) (19)	0,0059	1 : 85	1 : 28900
Massachusetts (Shih) (29)	0,0023	1 : 216	1 : 187000

Die in dieser Arbeit errechneten Genfrequenzen für heterozygote Genträger ist größer als erwartet. Der Grund dafür liegt möglicherweise darin, daß Homozygotkranke der "Duarte-Variante" das Bild in geringem Maße fälschen. Während nämlich die Heterozygotkranken dieses Polymorphismus etwa 75% der normalen Gal-1-PUT-Aktivität aufweisen, ist die Enzymaktivität bei

den Homozygoten der "Duarte-Variante" auf 50% der Norm gesunken, entspricht also den Werten von Heterozygoten der klassischen Galaktosämie.

Die folgende Tabelle veranschaulicht die Gal-1-PUT-Aktivität bei den verschiedenen Genotypen⁽³³⁾:

Genotyp	Gal-1-PUT-Aktivität	relative Aktivität
N - N	12 - 19 U / g Hb	100 %
N - D	9 - 11 U / g Hb	75 %
D - D	5 - 7 U / g Hb	45 - 50 %
G - N	6 - 8 U / g Hb	45 - 60 %
G - G	0 - 2 U / g Hb	keine Aktivität
G - D	3 - 5 U / g Hb	25 - 30 %

N = Normaler Genotyp

G = Galaktosämie

D = "Duarte-Variante"

Frequenzanalysen von B e u t l e r ⁽⁴⁾ und

M e l l m a n ⁽²⁴⁾ über das Vorkommen der

"Duarte-Variante" in Kalifornien zeigen, daß

etwa 10% bis 15% der Bevölkerung heterozygot

für diesen Polymorphismus sind. S i t z m a n n

und K a l o u d ⁽¹⁹⁾ fanden bei Untersuchungen

in Franken mit 11,1% und in der Steiermark

mit 12,4% ähnliche Werte. Diese Angaben können bestätigt werden, da sich für den Bezirk Bucsu 10,3% und für die Vergleichsgruppe 11,0% ergaben.

Die Vermutung, unterschiedliche Ergebnisse in den Normalwerten und Genfrequenzen für die homogene Bevölkerung Bucsus und die heterogene Population der Vergleichsgruppe zu erhalten, hat sich nicht bestätigt. Sowohl die Normalwerte der Gal-1-PUT-Aktivität bei Gesunden als auch die der Heterozygoten zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den gegenübergestellten Probanden.

Auch die Genfrequenzanalysen führten zu keinen differierenden Ergebnissen. So war die Heterozygotenfrequenz in Bucsu 0,017 und in der Vergleichsgruppe 0,021. Für die "Duarte-Variante" ergaben sich Werte von 0,01 und 0,011.

Dies war nicht zu erwarten, da frühere Untersuchungen zeigten, daß beim Gal-1-PUT-Defekt, wie bei allen autosomal rezessiv vererbten Stoffwechselleiden, die Konsanguinität eine große Rolle spielt.

So fanden K a l o u d ⁽¹⁸⁾ und S i t z m a n n
in einer Familie mit zwei homozygoten Galak-
tosämikern nach Untersuchung der gesamten
Sippe 21 heterozygote Genträger. In einem
zweiten Fall ermittelten sie 28 Heterozygote
einer Familie, in der ein homozygotkrankes
Kind aufgefallen war. ⁽²⁰⁾

Die Galaktosämie ist eine autosomal rezessiv vererbte Anomalie des Galaktosestoffwechsels. Aufgrund des Gal-1-PUT-Defektes ist die Metabolisierung von Galaktose stark eingeschränkt. Schwerwiegende Symptome dieser Krankheit sind Hepatosplenomegalie, Katarakt und geistige Retardierung. Da die Galaktosämie in ursächlichem Zusammenhang mit der Ernährung durch Laktose steht, kann den Galaktosämiker nur eine früheinsetzende, milchzuckerfreie Kost vor schweren Folgeschäden schützen.

Die Fragestellung in dieser Arbeit war nun, ob die Genfrequenz des Gal-1-PUT-Defektes im westungarischen Zigeunerisolat Bucsú mit seiner relativ homogenen Bevölkerung größer ist als in der Vergleichsgruppe der relativ heterogenen Population des Bezirks Vas.

Mit Hilfe des UDP-Glc-Konsumtionstests nach Beutler wurde die Gal-1-PUT-Aktivität im Erythrozytenhämolysat von 674 Blutspendern Westungarns gemessen. Die Probanden setzten

sich aus 303 Spendern Bucsus und 371 Spendern der Vergleichsgruppe zusammen.

Als Durchschnittswerte der Gal-1-PUT-Aktivität errechneten sich mit $15,9 \pm 3,0 \text{ U / g Hb}$ und $16,0 \pm 3,4 \text{ U / g Hb}$ in beiden Fällen annähernd gleiche Mittelwerte für das Enzym, das keine Altersabhängigkeit aufwies. Die Werte waren normal verteilt.

Bei fünf Heterozygoten aus dem Bezirk Bucsu wurde eine durchschnittliche Gal-1-PUT-Aktivität von $5,7 \pm 2,7 \text{ U / g Hb}$ gefunden, bei drei Probanden der "Duarte-Variante" wurde ein Wert von $10,5 \pm 0,7 \text{ U / g Hb}$ ermittelt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Vergleichsgruppe überein. Hier fand sich bei acht Heterozygoten ein Mittelwert von $7,7 \pm 1,8 \text{ U / g Hb}$, bei vier Probanden der "Duarte-Variante" $10,0 \pm 0,7 \text{ U / g Hb}$.

Das Ziel dieser Arbeit, eine höhere Genfrequenz des Gal-1-PUT-Defektes in einer homogenen Bevölkerung als in einer heterogenen Population zu finden, bestätigte sich nicht.

Die Genfrequenz der klassischen Galaktosämie ergab für Bucsú einen Wert von 0,0085, für die Vergleichsgruppe 0,001. Dies entspricht einer Heterozygotenfrequenz von 1 : 59 bzw. 1 : 48. Eine größere Übereinstimmung in den beiden Kollektiven gab es bei den Genfrequenzen für die "Duarte-Variante" von jeweils 0,05. Für die Heterozygotenfrequenz dieses Polymorphismus wurde für Bucsú ein Verhältnis von 1 : 97, für die Vergleichsgruppe 1 : 91 ermittelt.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Anderson, E.P., H.M. Kalckar, K. Kurahashi,
K. J. Isselbacher: A specific enzymatic assay
for the diagnosis of congenital galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 50, 469 (1957).
- (2) Beutler, E., M.C. Baluda: A simple screening
spottest for galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 68 (1966), 137.
- (3) Beutler, E., M.C. Baluda: Improved method
for measuring galactose-1-phosphate-uridyl-
transferase activity in erythrocytes.
Clin. chim. Acta 13, 369 (1966).
- (4) Beutler, E., M.C. Baluda, Ph. Sturgeon,
R.W. Day: The Duarte Variante of galactose-
1-phosphate-uridyltransferase a prevalent
allele of gene for galactosemia.
J. Clin. Invest. 44, 1028 (1965).
- (5) Brandt, N. J.: Frequency of heterozygotes for
hereditary galactosemia in a normal population.
Acta genet. 17, 189 (1967).
- (6) Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie
Walter de Gruyter, S. 179 (1972)

- (7) Cuartrecasas, P., S. Segal: Galactose
conversion to D-xylose: an alternate route
of galactose metabolism.
Science 153, 549 (1966).
- (8) Cuartrecasas, P., S. Segal: The galactonic
acid pathway: a new route for galactose
metabolism in mammals.
J. Clin. Invest. 45, I. 999 (1966).
- (9) Grüner, H.D.: Stoffwechselbedingte Schwach-
sinnsformen und ihre Erkennung.
Z. klin. Chemie 3, 123 (1966).
- (10) Gitzelmann, R., H.C. Curtius, I. Schneller:
Galactitol and galactose-1-phosphate in the
lens of a galactosemic infant.
Exper. Eye Res. 6, 1 (1967).
- (11) Göppert, F.: Galaktosurie nach Milchzucker-
gabe bei angeborenem familiären, chronischem
Leberleiden.
Berlin. Klin. Wschr. 54, 473 (1917).

- (12) McGuinness, R., R.A. Sounders: Erythrocytic-galactose-1-phosphate-uridyltransferase and glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity in the population of Rhonda Fach.
Clin. chim. Acta 16, 221 (1967).
- (13) Hansen, R.G., R.K. Bretthauer, J. Mayes, J.H. Norden: Estimation of the frequency of occurrence of galactosemia in the population.
Proc. Soc. exp. Med. Biol. 115, 560 (1964).
- (14) Hsia, D.Y.Y., J.A. Tannerbaum, J. Schneider, K. Huang, K. Simpson: Further studies on the heterozygotes carriers in galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 56, 368 (1960).
- (15) Isselbacher, K. J.: Evidence for an accessory pathway of galactose metabolism.
J. Clin. Invest. 36, 920 (1957).
- (16) Kalckar, H.M., E.P. Anderson, K. J. Isselbacher: Galactosemia, a congenital defect in an nucleotide transferase.
Bioch. Biophys. Acta 20, 262 (1956).

- (17) Kaloud, H., F.C. Sitzmann: Enzymopathien
des Galaktosestoffwechsels.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 387-388 (1971).
- (18) Kaloud, H., F.C. Sitzmann: Ergebnisse
klinischer und biochemischer Untersuchungen
bei einer Sippe mit Erkrankungen an Galaktos-
ämie.
Arch. f. Kinderheilk. (1971).
- (19) Kaloud, H., F.C. Sitzmann: Genfrequenz der
hereditären Galaktosämie unter Berücksichti-
gung der Duarte-Varianten.
Z. Kinderheilk. 113, 207 (1972).
- (20) Kaloud, H., F.C. Sitzmann: Untersuchungen
bei einer weiteren Sippe mit einem Erkan-
kungsfall an Galaktosämie.
Arch. Kinderheilk. 183, 225 (1971).
- (21) Komrower, G.M., V. Schwarz, A. Holzel,
L. Goldberg: A clinical and biochemical
study of galactosemia. A possible explanation
of the nature and biochemical lesion.
Arch. Dis. Childh. 31, 254 (1956).

- (22) Kurahashi, K., A. Sugimura: Purification and properties of galactose-1-phosphate-uridylyltransferase from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 235, 940 (1960).
- (23) Ley, J. de, M. Doudoroff: The metabolism of D-galactose on *Pseudomonas Saccherophila*.
Biol. Chem. 227, 745 (1957).
- (24) Mellman, W. J., T. A. Tedesco, P. Feigl: Estimation of the gene frequency of the Duarte Variante of galactose-1-phosphate-uridylyltransferase.
An. Hum. Genet. 31, 1 (1968).
- (25) Nelson, K., D. Y. Y. Hsia: Screening for galactosemia and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in newborn infants.
J. Pediat. 71, 582 (1967).
- (26) Quan-Ma, R., W. W. Wells: The distribution of galactitol in tissues of rats fed galactose.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 486 (1965).
- (27) Richterich, R.: Klin. Chemie. Akademische Verlagsges., Frankfurt/Main (1966).

- (28) Reuss, A. von: Zuckerausscheidung im Säuglingsalter.
Wien. med. Wschr. 58, 799 (1908).
- (29) Shih, V.E., H.J. Levy, V. Karolkewicz,
S. Houghton, M.L. Efron, K.J. Isselbacher,
E. Beutler, R.A. McCready: Galactosemia
screening of newborns in Massachusetts.
N. Engl. J. Med. 284, 753 (1971).
- (30) Sitzmann, F.C., H. Kaloud: Das Krankheits-
bild der Galaktosämie.
Klinikerarzt 1, 172 (1972).
- (31) Sitzmann, F.C.: Unsere heutigen Kenntnisse
über die Galaktosämie.
Med. Klin. 63, 781 (1968).
- (32) Sitzmann, F.C., H. Kaloud: Angeborene
Störungen des Galaktosestoffwechsels.
Med. Klin. 70, 491 (1975).
- (33) Sitzmann, F.C., H. Kaloud: Die Varianten
der Galaktosämie.
Klinikerarzt 12, 346 (1974).

- (34) Thalhammer, O., R. Gitzelmann, M.
Pantlischko: Hypergalactosemia and
galactosuria due to galactokinase
deficiency in a new-born.
Pediatrics 42, 441 (1968).
- (35) Tolstrup, N.: Hereditaer Galactosemi
Thesis.
Copenhagen, Arne, Forst-Hansen (1965).
- (36) Wells, W.W., T.A. Pittman, H.J. Wells,
T. J. Egan: The isolation and identification
of galactitol from brains of galactosemia
patients.
J. biol. Chem. 240, 1002 (1965).
- (37) Wells, W.W., T.A. Pittman, T.J. Egan:
The isolation and identification of galac-
titol from the urin of patients with
galactosemia.
J. biol. Chem. 239, 3129 (1964).

Lebenslauf

Ich, Gerhard Moll, wurde am 18. Januar 1950 in Bremen-Blumenthal als zweiter Sohn des Kaufmanns Hinrich Moll und dessen Ehefrau Annegret, geb.

Havighorst, geboren. Im Jahre 1956 wurde ich in die Rönnebecker Grundschule an der Helgenstraße eingeschult. Ab Ostern 1960 besuchte ich das Gerhard-Rohlf's-Gymnasium in Bremen-Vegesack, wo ich am 24. Mai 1968 das Abitur erfolgreich ablegte.

1964 wurde ich in der evangelischen Kirche in Bremen-Farge konfirmiert.

In der Zeit von Oktober 1968 bis Oktober 1971 war ich für drei Jahre als Lehrling in einem Bremer Dental-Labor beschäftigt.

Seit November 1971 bin ich Student der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen, wo ich im Sommer 1972 das Vorphysikum und im Frühjahr 1974 das Physikum bestand. Am 7. Dezember 1976 bestand ich die Zahnärztliche Prüfung.

Erlangen, im Dezember 1976

Gerhard Moll

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197